Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über die Freisetzung von Wirkstoffen aus Kaninchengranulozyten durch Newcastle disease Virus

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Evers

aus Waidhofen / Ybbs, Österreich

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg (Lahn)
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen über die Freisetzung von Wirkstoffen aus Kaninchengranulozyten durch Newcastle disease Virus

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität Marburg

vorgelegt von

Dieter Evers

aus Waidhofen / Ybbs, Österreich

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg am 26. Juni 1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr. rer. nat. P. Karlson
Referent: Professor Dr. med. Rudolf Siegert
Correferent: Professor Dr. med. Dr. med. dent.
Hans Heuser

Meinen Eltern gewidmet

Allen meinen Lehrern, insbesondere Herrn Prof. Dr.med. R. S i e g e r t, der mich bei der Durchführung der Arbeiten in großzügiger Weise unterstützte, sowie Herrn Dr. rer.nat. W. P o l l m a n n, bin ich zu tiefem Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	
1. Züchtung des Newcastle disease Virus	8
2. Gewinnung der Kaninchengranulozyten	9
3. Isolierung der Granulozytengranula	9
4. Durchführung der Versuche in vivo	11
5. Durchführung der Versuche in vitro	12
6. Pyrogenmessungen	13
7. Enzymbestimmungen	14
a) Lactatdehydrogenase	14
b) Trypsin	15
c) Lipase / Esterase	15
d) Lysozym	17
e) Alkalische Phosphatase	17
C. ERGEBNISSE	
1. In-vivo-Versuche am Kaninchen	19
2. In-vitro-Versuche mit Granulozytengranula	20
a) Lactatdehydrogenase	20
b) Trypsin	21
c) Lysozym	22
d) Lipase / Esterase und alkalische Phosphatase	22
e) Pyrogenität	22
D. BESPRECHUNG	29
E. ZUSAMMENFASSUNG	35
F. LITERATUR	36

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0027

A. EINLEITUNG

Viren können als obligate Zellparasiten auf ihre Wirtszellen eine vielfältige Wirkung ausüben und zu funktionellen Störungen, aber auch zu morphologischen Schäden bis zur vollständigen Zerstörung der Zelle führen. Über die infizierten Körperzellen beeinflußt das Virus aber auch durch Induktion verschiedener zellulärer Wirkstoffe den Gesamtorganismus.

Zum Verständnis des Verhältnisses Virus - Wirtszelle, muß geklärt werden, in welcher Weise die Zelle durch das Virus geschädigt wird. In der ersten Phase lagert sich das Virion mit Hilfe von Rezeptoren der Zelloberfläche an die Zellmembran an. In der nun folgenden Phase der " Endocytose " wird das Virion von der Wirtszelle aufgenommen. Dieser Vorgang der aktiven Virusaufnahme durch die Wirtszelle wird auch " Viropexis " genannt. Ist das Virion in die Zelle gelangt, so zerfällt das Capsid des Virion unter Freisetzung der Nucleinsäure. Es befindet sich jetzt in der " Eklipse ". In dieser Phase ist es nicht mehr möglich, seine Infektiosität nachzuweisen. Schließlich werden in der " Reifungsphase " die auf Grund der genetischen Information in der Wirtszelle ge-

bildeten Viruskomponenten zu infektiösen Viruspartikeln zusammengesetzt. Hierauf erfolgt die " Ausschleusung ", die je nach Art des Virus kontinuierlich oder diskontinuierlich vor sich geht. Es sind aber auch Viren bekannt, die nach ihrem Eindringen in die Zelle nur zu einer abortiven Infektion führen.

Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit den Reaktionen zwischen Viren und Leukozyten befassen, obwohl die Leukozyten nicht nur bei Bakterien-, sondern besonders auch bei Virusinfektionen eine bedeutende Rolle spielen. Es wurde nämlich inzwischen festgestellt, daß die für eine Virusinfektion typischen und wichtigen Wirkstoffe, wie Interferon und endogenes Pyrogen, vor allem aus den Leukozyten stammen (SHU, KOHLHAGE, POLLMANN 1967).

Als Modell für Untersuchungen dieser Wirkstoffe hat sich besonders das System Myxovirus - Kaninchengranulozyt bewährt (SIEGERT, POLLMANN, SHU 1967, POLLMANN 1968).

Interferon aus Myxovirus infizierten, bebrüteten Hühnereiern wurde erstmals von ISAACS und LINDENMANN (1957) beschrieben. Die Autoren konnten zeigen, daß dieser Wirkstoff normale, nicht infizierte Zellen vor einer nachfolgenden Virusinfektion schützen kann.

Inzwischen wurde eine Fülle von weiteren Interferonen beschrieben, die von den verschiedensten Spezies stammen und heterogene Molgewichte zwischen 20000 bis 100000 besitzen. Alle Interferone sind Proteine oder Proteide, und nur durch Proteasen, aber nicht durch Nucleasen, inaktivierbar. Sie zeigen eine bemerkenswerte pH - und Hitzestabilität. Die Interferone wirken nur intrazellulär und zeigen dabei eine strenge Spezies - Spezifität, d.h. sie wirken nur in Zellen der homologen, nicht aber in der heterologen Spezies.

Die Interferone wirken aber nicht wie neutralisierende Antikörper, und blockieren intrazellulär auch nicht direkt die Virusvermehrung, sondern induzieren die Synthese eines weiteren Wirkstoffes, der schließlich für die Vermehrungshemmung verantwortlich ist.

Bei der Injektion von Kaninchen mit Myxoviren konnte gezeigt werden (SIEGERT, SHU, KOHLHAGE, 1967), daß die Fieberreaktion und die Interferontiter im Serum streng parallel verlaufen.

Neben dem Interferon wird nach Induktion von Myxovirus auch noch endogenes Pyrogen gebildet und freigesetzt. Myxoviren (Influenza - oder Newcastle disease Virus) besitzen nämlich neben den Funktionen der Infektiosität,

der Toxizität und der Haemagglutininaktivität noch eine davon völlig unabhängige Eigenschaft, die Pyrogenität (SIEGERT und BRAUNE, 1964).
Die Entstehung des Fiebers jedoch hat ihre Ursache in der Induktion eines körpereigenen Fieberstoffes, des endogenen Pyrogens, das zellulären Ursprungs ist (SIEGERT 1967, ATKINS 1958). Versuche von BERTRONG und CLUFF 1953 sowie von COLLINS und WOOD 1959 mit Bakterienendotoxinen wiesen darauf hin, daß dieser endogene Fieberstoff vorwiegend in den Leukozyten entsteht und entweder direkt oder über zwischengeordnete Prozesse auf das Temperaturregulationszentrum (Hypothalamus) wirkt (3, 30).
Der Nachweis von endogenem Pyrogen gelingt durch Übertragung von Blut oder Serum aus Kaninchen, die maximal Fieber zeigen, auf normale Tiere. Diese Empfängertiere reagieren fast ohne Latenz mit einer Temperaturerhöhung (28). Ein weiterer endogener Fieberstoff ist das thermische Pyrogen, welches ohne Stimulierung durch mehrstündige Inkubation von Exsudat - Granulozyten freigesetzt wird (21).
Alle endogenen Pyrogene scheinen Proteine oder Proteide darzustellen, da sie durch proteolytische

Enzyme leicht inaktivierbar sind (21, 28). Sie lassen sich ferner durch Hitzebehandlung (30 Minuten bei 90° C) relativ einfach inaktivieren (21, 28). Die Molgewichte sind bisher für das thermische Pyrogen mit 10.000 - 20.000 (21) und für das virusinduzierte Granulozytenpyrogen mit 30.000 - 40.000 angegeben worden. Ein relativ hohes Molekulargewicht (55.000 - 65.000) scheint das virusinduzierte Serumpyrogen vom Kaninchen zu besitzen. Ein hochmolekularer Anteil (Molgewicht etwa 100.000) sowie ein niedermolekularer Anteil (Molgewicht etwa 20.000) konnten beim endotoxinstimulierten Serumpyrogen vom Kaninchen beobachtet werden (RIECK und KOHLHAGE, Publikation in Vorbereitung).

Neben den Wirkstoffen Interferon und endogenem Pyrogen wird aber nach Virusinduktion auch eine Reihe von Enzymen in der Zelle aktiviert und zum Teil freigesetzt (1).

Es war daher Ziel der vorliegenden Untersuchungen, den Einfluß einer Virusinfektion in vivo und in vitro auf die Aktivitätsänderungen einer Reihe bekannter Enzyme, sowie auf die Freisetzung von endogenem Pyrogen zu studieren.

Untersuchungen in vivo führten wegen der großen Verdünnung der eventuell in das Serum abgegebenen Zellenzyme wahrscheinlich nur zu geringen Veränderungen der Serumwerte. Es sollten daher gleichzeitig Versuche in vitro an isolierten Granulozyten durchgeführt werden. Hier können Änderungen der Enzymausschüttungen den Meßmethoden leichter zugänglich gemacht werden. Mit verhältnismäßig einfachen Mitteln lassen sich dafür Granulozyten in großen Mengen aus der Bauchhöhle von Kaninchen gewinnen.

Da es sich bei den Granulozyten um enzymatisch hochaktive Zellen handelt, sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang das Virus eine Enzymausschüttung bewirkt. Es wurden die Enzymaktivitäten von Lactatdehydrogenase, Lysozym, Trypsin, alkalischer Phosphatase und Lipase beobachtet. Bei der Lactatdehydrogenase handelt es sich um ein wichtiges Enzym der Glykolyse. Lysozym ist ein normaler bakterizider Stoff. Während das Trypsin einen Eiweiß spaltenden Enzymkomplex darstellt, gehört die alkalische Phosphatase zu den Hydrolasen. Die Lipase spaltet Fett in Glycerin und Fettsäure.

Die Hauptenzymträger sind die Granula - Lysosomen der Granulozyten. Sie sind zwar schon im Jahre 1879 durch

EHRLICH (10) entdeckt worden, aber trotz dieser Tatsache liegen bisher nur wenige Arbeiten vor, die sich mit ihrer Struktur und Funktion befassen.
Diese Granula lassen sich aus den Granulozyten durch Zerstörung der Zellwand isolieren (5). Hierbei werden die Zellwände unter der Einwirkung von kalter Sucroselösung zerstört, und die Zellwandtrümmer, die schwerer sind als die Granula, abzentrifugiert, so daß die Granula im Überstand bleiben.
Für die Untersuchungen schien das Newcastle disease Virus, ein Myxovirus, besonders geeignet, weil es sich mit verhältnismäßig einfachen Methoden in großen Mengen züchten läßt.

B. MATERIAL UND METHODEN

1) Züchtung des Newcastle disease Virus
(Stamm: Italien)

In die Allantoishöhle zehn Tage alter Hühnerembryonen wurde 0,1 ml Virussuspension (ca. 10^3 ID_{50}) in gepufferter physiologischer Kochsalzlösung injiziert. Nach weiterer Bebrütung von 24 Stunden bei 37,5° C sind die Embryonen durch Kälteschock bei 4° C abgetötet worden. Nach Ernte der blutfreien Allantoisflüssigkeiten erfolgte die Sterilitätsprüfung mittels Blutagarplatten. Die vereinigten Allantoisflüssigkeiten wurden zuerst niedertourig und dann in der SPINCO - Ultrazentrifuge eine Stunde lang bei ca. 6000 g zentrifugiert. Das mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommene Sediment wurde zur weiteren Reinigung und Konzentrierung nochmals hochtourig zentrifugiert. Nach der Haemagglutininbestimmung (SEVER 1962) ist die Konzentration der Virussuspension auf 12000 Einheiten (HE/ml) eingestellt worden.

2) Gewinnung der Kaninchengranulozyten

Je nach dem Körpergewicht (2 - 3 kg) der Kaninchen (konventionelle Tiere verschiedener Züchter) wurden 350 - 500 ml einer sterilen physiologischen Kochsalzlösung mit einem Stärkegehalt von 0,1 % unter Nembutalnarkose (40 mg / kg Körpergewicht) intraperitoneal infundiert. Die Infusionslösung enthielt ferner 100 µg Streptomycin / ml und 100 Einheiten Penicillin / ml. Nach Ablauf von 12 - 15 Stunden wurde das Exsudat nach Tötung der Tiere aus den eröffneten Bauchhöhlen entnommen. Die Exsudatausspülung erfolgte mit steriler physiologischer Kochsalzlösung, der 100 µg Heparin / ml zugesetzt waren. Das Exsudat wurde bei etwa 400 g fünf Minuten lang zentrifugiert, und das Sediment zur Bestimmung der Zellzahl in der NEUBAUER - Zählkammer in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Zirka 90 % dieser so gewonnenen Leukozyten waren Granulozyten. Die Zellausbeute betrug durchschnittlich 1 x 10^9 Leukozyten pro Tier.

3) Isolierung der Granulozytengranula

Die Isolierung der Granula aus den Granulozyten erfolgte nach dem Verfahren von HIRSCH und COHN (5). Nach Be-

stimmung der Zellzahl in der Zählkammer nach THOMA wurden die Granulozyten bei ca. 400 g fünf Minuten lang abzentrifugiert, und das Sediment mit 50 ml steriler kalter (4^{o} C) 0,34 M Sucroselösung (pro 2×10^{9} Granulozyten) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei ca. 300 g 30 Sekunden lang wurde das Sediment mit 100 ml steriler, kalter 0,34 M Sucroselösung im Homogenisator behandelt, anschließend bei ca. 300 g zentrifugiert, und der trübe Überstand entfernt. Das Sediment wurde erneut in 50 ml Sucroselösung aufgenommen, homogenisiert und nochmals bei ca. 300 g zentrifugiert. Durch die Einwirkung der Sucroselösung wurden die Zellmembranen der Granulozyten weitgehend zerstört. Vervollständigt wurde die Zellyse durch eine einstündige Behandlung im Glashomogenisator. Bei niedertouriger Zentrifugation (300 g) sedimentierten die zerstörten Zellwände, während im Überstand die kleineren Granula in Suspension blieben. Die Granulasuspension wurde dann 20 Minuten lang hochtourig bei ca. 10000 g zentrifugiert, das so erhaltene Granulasediment in 40 ml Sucroselösung aufgenommen und nochmals homogenisiert. Um sicher zu sein, daß die Zellmembranen vollständig zerstört waren, wurden die einzelnen Schritte unter

dem Mikroskop in Ausstrichpräparaten kontrolliert (Eosin - Methylenblau Färbung).

4) Durchführung der Versuche in vivo

Es wurden jeweils zwei Kaninchen verwendet, deren Körpertemperatur rektal mit Hilfe eines Widerstandsthermometers, einer Sonde und eines Schreibers der Firma HARTMANN & BRAUN, Frankfurt, registriert worden ist. Am ersten Tag wurden den Tieren, nachdem sie an den Temperaturschreiber angeschlossen waren, nach 30, 60, 180 und 300 Minuten jeweils 4 cm^3 Blut aus der Ohrrandvene entnommen. Am zweiten Tag erhielten die Kaninchen im Anschluß an eine Blutentnahme (4 ml) 4000 - 6000 HE Newcastle disease Virus intravenös. Nach diesem Zeitpunkt erfolgten weitere Blutentnahmen im Abstand von 30, 60, 180 und 300 Minuten. Zur Verhinderung der Blutgerinnung wurde das Blut in steriler Kochsalz - Heparinlösung aufgenommen, die sich in den Spritzen befand. Die Blutproben wurden bei ca. 450 g zehn Minuten lang zentrifugiert, und die klaren Überstände für die Enzymbestimmungen verwendet.
Der erste Versuchstag diente bei laufender Temperaturkontrolle der Bestimmung der normalen Enzymwerte im

Serum der Kaninchen. Am zweiten Tag erfolgte die Virusinjektion zur Untersuchung der Frage, ob sich unter Viruseinfluß die Enzymwerte verändern.

5) Durchführung der Versuche in vitro

a) Um festzustellen, ob sich die Enzymaktivität der nach dem Verfahren von HIRSCH und COHN (5) gewonnenen Granula unter Viruseinfluß verändert und ein endogenes Pyrogen entsteht, sind Inkubationsansätze hergestellt worden. Die von einer Granulozytenmenge von ca. 2×10^9 gewonnenen Granula wurden in 40 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Hierzu kamen je nach der ursprünglichen Granulozytenmenge ca. 3000 - 6000 HE Newcastle disease Virus. Dieses Gemisch wurde zwei Stunden lang unter ständigem magnetischen Rühren bei einer Temperatur von 37° C im Wasserbad inkubiert, wobei Veränderungen des pH - Wertes automatisch mit N / 100 NaOH über ein Magnetventil im Autotitrator (RADIOMETER) ausgeglichen wurden. Es erfolgten nach 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten Entnahmen von jeweils zwei ml für die Enzymbestimmungen. Als Kontrolle diente ein zweiter Ansatz, der an Stelle des Virus zum Volumenausgleich

sterile physiologische Kochsalzlösung enthielt.
b) Zur Untersuchung des virusinduzierten körpereigenen Fieberstoffs dienten ebenfalls zwei Inkubationsansätze. Der eine enthielt wiederum die Granulafraktion, gewonnen aus ca. 2 x 10^9 Granulozyten, in 40 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung, der andere Ansatz an Stelle der Granula die Zellwandfraktion. Nach zweistündiger Inkubationszeit im Wasserbad bei 37° C wurden die Suspensionen bei ca. 6000 g eine Stunde lang in der SPINCO - Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Messung der Pyrogenität erfolgte am Kaninchen.

6) Pyrogenmessungen

Nachdem die Viren in der Ultrazentrifuge eine Stunde bei ca. 6000 g abgeschleudert worden waren, wurde der weitgehend virusfreie Überstand auf Pyrogenität untersucht. Die Pyrogenprüfungen erfolgten intravenös an jeweils zwei bis vier Kaninchen (2 - 3 kg). Die Injektionsvolumina lagen bei 1 - 10 ml; sie waren abhängig von der ursprünglichen Granulozytenkonzentration und der verwendeten Virusmenge. Die Temperaturmessungen erfolgten rektal mit Widerstandsthermometer, Sonde und Schreiber der Firma HARTMANN & BRAUN, Frankfurt. Alle

verwendeten Flüssigkeiten waren auf Sterilität und Keimfreiheit geprüft, und die Arbeitsgeräte eine Stunde lang bei 180° C sterilisiert worden.

7) Enzymbestimmungen

a) Lactatdehydrogenase - Aktivität

Die Lactatdehydrogenase wurde mittels der Biochemica Test Combination TC - G, der Firma BOEHRINGER und SÖHNE Mannheim, in Anlehnung an das Verfahren von F. WROBLEWSKI und J. S. LA. DUE (30), bestimmt.

Die Reaktion verläuft nach folgender Gleichung:

Pyruvat + reduz. Nicotinamid-adenin-dinucleotid + H^+ ⟷ Lactat + Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Die Ermittlung der Aktivität der Lactatdehydrogenase erfolgt aus der Geschwindigkeit der durch diese Reaktion hervorgerufenen NADH - Abnahme.

3 ml eines 0,05 M Phosphatpuffers, pH 7,5 + 0,0003 M Pyruvat und 0,05 ml 0,009 M NADH wurden mit 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung gemischt; die Reaktionstemperatur betrug 25° C. Der Extinktionsabfall wurde bei 366 mμ gemessen. Die Ablesung erfolgte nach 0, 1, 2 und 3 Minuten. Nach der Berechnung des Mittelwertes aus den Extinktionsdifferenzen und Multiplikation mit

dem Umrechnungsfaktor 9550 kommt man zu der Lactat-dehydrogenase - Aktivität in Millieinheiten (m. U.) pro ml Lösung.

b) Trypsin - Aktivität

Sie wurde mit Hilfe der Biochemica Test Combination TC - TR 15950 der Firma BOEHRINGER und SÖHNE, Mannheim, bestimmt. 2,5 ml eines 0,2 M Tris - Puffers, pH 7,8 + 0,025 M $CaCl_2$ und 0,3 ml 0,01 M Benzoylarginin - p - nitranilid wurden nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 25° C im Wasserbad mit 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung gemischt, und die Extinktion E_1 bei einer Wellenlänge von 405 mμ gemessen. Die Ablesung der Extinktion E_2 erfolgte nach fünf Minuten.

Die Berechnung:

$$E_2 - E_1 = E$$

Multipliziert man E mit dem Umrechnungsfaktor 100, so erhält man die Millieinheiten (m. U.) pro ml der Probe.

c) Lipase - Aktivität

Ihre Bestimmung erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von SELIGMAN und NACHLAS (24). Danach wird ß - Naphtyl - Laurat zu ß - Naphtol gespalten, welches mit tetra-

zotiertem Di - o - anisidin zu einem roten Farbstoff kuppelt. Als Stammlösung diente eine 0,1 % ige Naphtyl-Laurat Lösung in Aceton. Mit 5 ml dieser Lösung wurden 35 ml destilliertes Wasser und 10 ml 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Rühren unterschichtet, wobei sich eine milchige Suspension ergab. Der Bestimmungsansatz bestand aus 2,5 ml der frisch zubereiteten Naphtyl - Laurat - Suspension und 1 ml der zu untersuchenden Lösung. Die Kupplung mit 1 ml tetrazotiertem Di - o - anisidin erfolgte nach einer fünfstündigen Inkubationszeit im Wasserbad bei 37° C. Der Reaktionsablauf kam nach einer Minute durch Zugabe von 1 ml 40 % iger Trichloressigsäure zum Stehen. Der entstandene rote Farbstoff konnte durch Zugabe von 7 ml Essigsäureäthylester extrahiert, und die beiden Phasen durch Zentrifugation getrennt werden. Die Messung erfolgte bei 540 mμ gegen einen Reagenzien - Leerwert. Die Höhe der Extinktion steht im linearen Verhältnis zu der entstandenen Menge ß - Naphtol.

Herstellung des tetrazotierten Di - o - anisidin :

2,45 g Di - o - anisidin werden mit 3,2 ml konzentrierter Schwefelsäure und 100 ml kalter 1,4 % iger Natriumnitritlösung gelöst. Die Lösung erfolgt durch ständiges

Kühlen und Rühren.

d) Lysozym - Aktivität

In Anlehnung an die Arbeit von SMOLELIS und HARTSELL (32) konnte die Lysozym - Aktivität bestimmt werden. Es wurde eine Micrococcus - Lysodeicticus - Suspension in M / 15 Phosphatpuffer, pH 6,2, angesetzt, die eine Lichtdurchlässigkeit gegen Wasser von 20 % aufwies. Zu 2,5 ml der Micrococcus - Lysodeicticus - Suspension kamen 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung. Die Messung erfolgte nach 20 Minuten bei 540 mμ. Aus einer Eichkurve können die genauen Werte entnommen werden (Abb.1).

e) Alkalische Phosphatase - Aktivität

Ihre Bestimmung erfolgte nach der Biochemica Test Combination TC - P, 15987 der Firma BOEHRINGER und SÖHNE, Mannheim. Sie beruht auf der Hydrolyse von Natrium - p - nitrophenylphosphat. Der Bestimmungsansatz bestand aus 0,1 ml der zu untersuchenden Lösung, 1 ml einer Mischung von 0,05 M Glycinpuffer (pH 10,5), 0,0005 M $MgCl_2$ und 0,0055 M Natrium - p - phenylphosphat. Er wurde 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 10 ml einer 0,08 %igen Natronlauge hinzugegeben. Bei 405 mμ war die Extinktion gegen einen Reagenzienleerwert abzulesen. Zur Umrechnung in Millieinheiten (m. U.) pro

Milliliter muß der Umrechnungsfaktor 200 verwendet werden.

C. ERGEBNISSE

1. In - vivo - Versuche am Kaninchen

Es sollte festgestellt werden, ob sich die Serumwerte für alkalische und saure Phosphatase, Lysozym, Trypsin und Lipase unter Viruseinwirkung und in Abhängigkeit von der Pyrogenreaktion verändern. Die im folgenden angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 60 bis 90 Bestimmungen. Die Schwankungen betragen ca. $\pm$ 15 %.
Die Serumwerte normaler Kaninchen betrugen:

alkalische Phosphatase : 2,2 m.U. / ml
saure Phosphatase : 3,8 m.U. / ml
Lysozym : 0,125 µg / ml
Trypsin : 13,25 m.U. / ml
Lactatdehydrogenase : 185,3 m.U. / ml
Lipase : Der Lipasenachweis ergab keine Werte.

Die Serumwerte, die in den zu verschiedenen Abständen nach den Virusinjektionen entnommenen Blutproben festgestellt worden waren, ließen keine signifikanten Abweichungen von der Norm erkennen. Diese Untersuchungen wurden deshalb nicht mehr fortgesetzt.

2. In - vitro - Versuche mit Granulozytengranula

Es ist bekannt, daß die stoffwechselaktiven Granulozyten in vivo unter Viruseinfluß Enzyme und Wirkstoffe freisetzen. Es fehlen aber noch Untersuchungen darüber, ob daraus isolierte Granulozytengranula in vitro ebenfalls dazu in der Lage sind, und wie sich insbesondere die Enzyme Lactatdehydrogenase, Trypsin, Lysozym, Lipase und alkalische Phosphatase verhalten. Da die gefundenen Werte von der Ausgangsmenge an Granulozyten und Virus abhängig sind, werden die Veränderungen sowohl in ihren Maßeinheiten als auch in Prozent angegeben.

a) Lactatdehydrogenase

Die Werte für die Lactatdehydrogenase (Abb.2) lagen in der normalen Granulasuspension vor der Viruszugabe bei 57,3 m.U. / ml. Nach der Zugabe des Newcastle disease Virus stiegen sie steil an und betrugen 30 Minuten später 124,1 m.U. / ml, was einer Zunahme um 118,3 % entsprach. Hiernach nahm der Lactatdehydrogenase - Gehalt wieder ab und lag nach 60 Minuten bei 95,5 m.U. / ml, was immer noch einer Erhöhung um 66,6 % über dem Ausgangswert bedeutete. Nach 90 Minuten war die Lactatdehydrogenase schließlich auf 76,5 m.U. / ml (33,5 % Erhöhung) abgefallen. Im Kontrollansatz fand

sich ebenfalls ein Anstieg der Lactatdehydrogenase, der allerdings längst nicht so schnell und steil verlief wie in dem Inkubationsansatz mit Virus. Sie erreichte erst nach 90 Minuten einen Wert von 83,2 % über der Norm. Diese Gegenüberstellung läßt deutlich erkennen, daß die Zugabe von Newcastle disease Virus eine erhöhte Lactatdehydrogenase - Ausschüttung bewirkt.

b) Trypsin

Die Granulasuspension enthielt vor der Viruszugabe eine Enzymaktivität von 1,5 m.U. / ml Trypsin (Abb.3). 30 Minuten nach der Zugabe von Newcastle disease Virus sanken die Werte vorübergehend etwas ab, um nach 60 Minuten Inkubationszeit auf 6,25 m.U. / ml (313,3 % Erhöhung) anzusteigen, während der Kontrollansatz nur eine Zunahme auf 2,5 m.U. / ml (66,6 % Erhöhung) aufwies. Nach 90 Minuten lagen die Werte des Inkubationsansatzes mit Virus bei 8,75 m.U. / ml (483,3 % Erhöhung), während im Kontrollansatz ohne Virus die Aktivität um 2,5 m.U. / ml betrug. Durch die Zugabe des Newcastle disease Virus ließ sich also eine stark vermehrte Trypsinausschüttung hervorrufen.

c) Lysozym

Bei Messung der Lysozymmenge (Abb. 4 und 5) in der Granulasuspension, deren Ausgangswert einer Lichtdurchlässigkeit von 56 % ca. 0,65 µg entsprach, konnte ein deutlicher Anstieg der Aktivität beobachtet werden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten nach Viruszugabe hatte sich die Lichtdurchlässigkeit auf 63 % (2,0 µg / ml) erhöht, was einem Anstieg auf 207,6 % entsprach. Diese Enzymmenge lag auch noch nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten vor. Nach 90 Minuten war die Enzymaktivität wieder auf den Ausgangswert gesunken. Im Kontrollansatz wurde ein nur geringer Anstieg beobachtet, dessen Maximum nach 90 Minuten 53,8 % erreichte, um dann wieder abzusinken.

d) Lipase / Esterase und alkalische Phosphatase

Unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen konnte eine Aktivität von Lipase / Esterase und alkalischer Phosphatase innerhalb von zwei Stunden nach Zusatz von Newcastle disease Virus ebensowenig wie im Kontrollansatz nachgewiesen werden.

e) Pyrogenität

Wie unter 5b beschrieben, war schließlich auch die

Frage geprüft worden, ob die durch das Newcastle disease Virus hervorgerufene Bildung des endogenen Fieberstoffes in den Granula oder in der Zellwand erfolgt. Ein Inkubationsansatz enthielt eine Granulasuspension, während der andere die zugehörigen Zellmembranen der Granulozyten umfaßte. Die Überstände beider Ansätze wurden Kaninchen injiziert. Hierbei führte nur der Überstand der Granulasuspension zur Fieberreaktion, wobei sich die Körpertemperatur um durchschnittlich 1,6° C erhöhte. Der Überstand der Zellwandsuspension hingegen war apyrogen. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Bildung eines endogenen Pyrogens in den Granulozytengranula erfolgt.

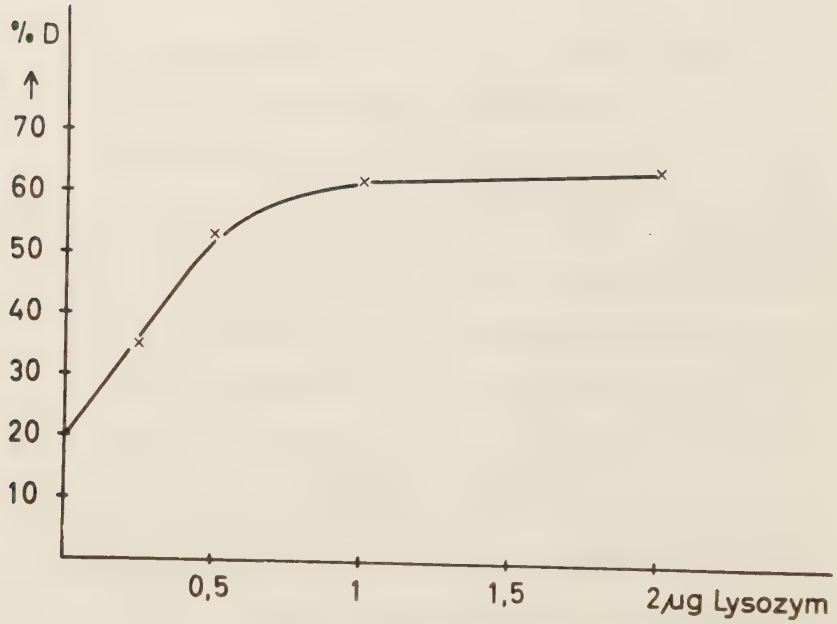

Abbildung 1 : Eichkurve zur Lysozymbestimmung.
Aufgetragen ist die Lichtdurchlässigkeit gegen µg Lysozym.

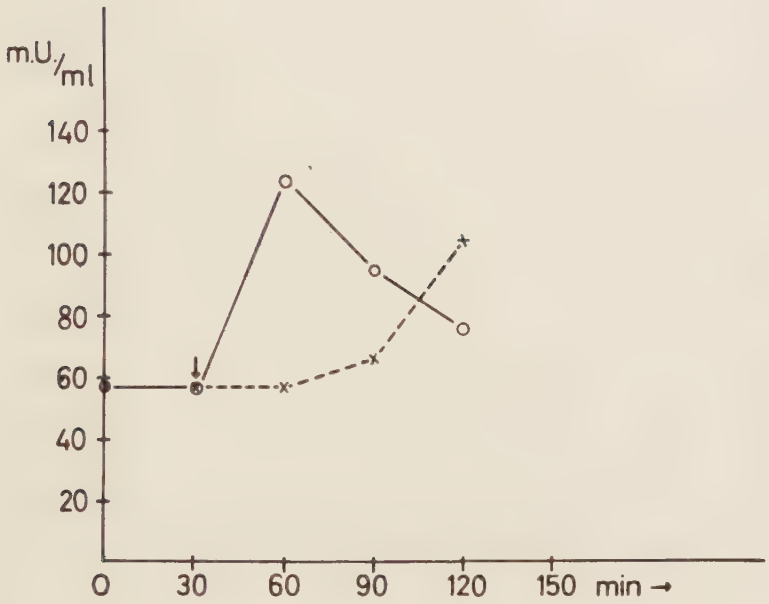

Abbildung 2 : Meßkurve der Lactatdehydrogenase - Aktivität von isolierten Granulozyten - Granula (Ausgangsmenge 2,0 x 10^9 Granulozyten)

- o - Meßkurve vor und nach der Viruszugabe (↓= 3000 HE Newcastle disease Virus)

- x - Kontrollkurve vor und nach der Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung (↓ = physiologische Kochsalzlösung)

Aufgetragen ist die Lactatdehydrogenase - Aktivität in m.U. / ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

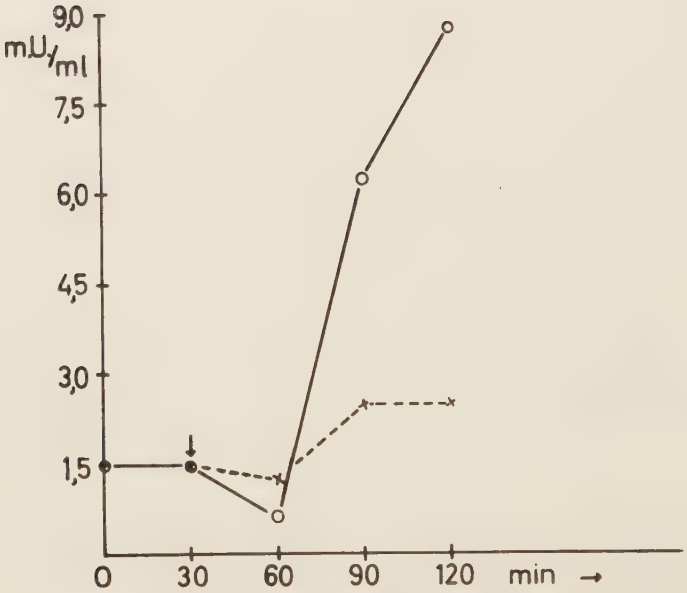

Abbildung 3 : Messung der Trypsin - Aktivität von isolierten Granulozyten - Granula

(Ausgangsmenge 2,0 x 10^9 Granulozyten)

- o - Meßkurve vor und nach der Viruszugabe (↓= 3000 HE Newcastle disease Virus)
- x - Kontrollkurve vor und nach der Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung (↓ = physiologische Kochsalzlösung)

Aufgetragen ist die Trypsin - Aktivität in m.U. / ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

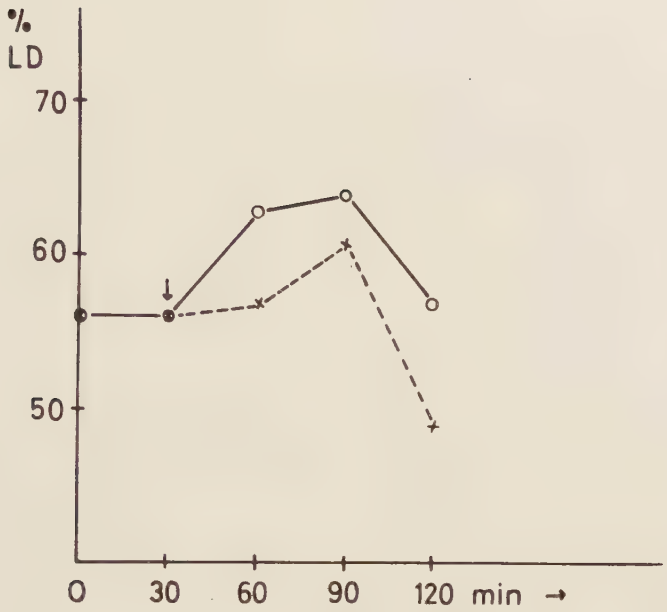

Abbildung 4 : Messung der Lysozym - Aktivität (in % Lichtdurchlässigkeit) von isolierten Granulozytengranula.

- o - Meßkurve vor und nach der Viruszugabe (↓ = 3000 HE Newcastle disease Virus)
- x - Kontrollkurve vor und nach der Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung (↓ = physiologische Kochsalzlösung)

Aufgetragen ist die Lysozym - Aktivität in % Lichtdurchlässigkeit bei 540 mμ (Micrococcus - Lysodeicticus - Suspension) gegen die Versuchsdauer in Minuten.

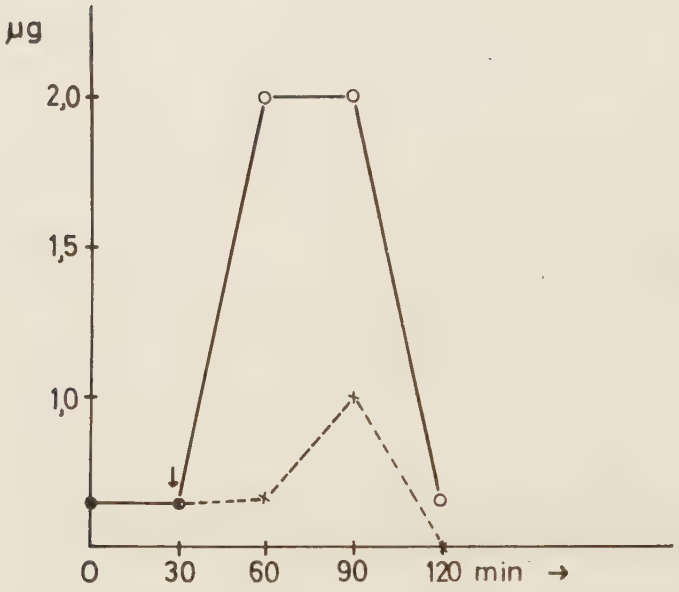

Abbildung 5 : Messung der Lysozym - Aktivität von isolierten Granulozyten - Granula (Ausgangsmenge 2,0 x 10^9 Granulozyten)

- o - Meßkurve vor und nach der Viruszugabe (↓ = 3000 HE Newcastle disease Virus)

- x - Kontrollkurve vor und nach der Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung (↓ = physiologische Kochsalzlösung)

Aufgetragen ist die Lysozym - Aktivität in µg / ml gegen die Versuchsdauer in Minuten.

D. BESPRECHUNG

Es sollte zunächst geprüft werden, welchen Einfluß das Newcastle disease Virus auf die Enzymaktivitäten im Kaninchenserum ausübt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse ermöglichten es nicht, zu einem eindeutigen Schluß zu kommen, weil nur geringfügige Veränderungen einiger Enzymaktivitäten festgestellt wurden, die noch im Bereich des methodischen Fehlers liegen. Bei dem hohen Verdünnungsgrad der Enzyme im Serum sind reelle Schwankungen kaum zu erfassen.

Die Hauptenzymträger in den Granulozyten sind die Granula. Es war daher naheliegend, die Veränderungen der Enzymaktivitäten durch Versuche mit isolierten Granulozytengranula in vitro fortzusetzen und zu untersuchen, inwieweit das Newcastle disease Virus die Ausschüttung von Lipase, Trypsin, Lactatdehydrogenase, Lysozym und alkalische Phosphatase aus den Granula beeinflußt.
Wenn das Virus in die Zelle eingedrungen ist, liegt es allein oder zusammen mit anderen in Vakuolen. Zu diesem

Zeitpunkt ist es noch möglich, nach schonendem Aufschließen der Wirtszellen infektiöse Viren festzustellen. Die Viruspartikel werden in den Vakuolen starken morphologischen Veränderungen unterworfen. Nach ALLISON und MALLUCCI (1) geben die virusgeschädigten Granula (Lysosomen) Enzyme in das Zytoplasma, die eine Zerstörung der Viruspartikel bewirken. Wie und mit welcher Intensität diese lysosomalen Enzyme auf das Virus einwirken, dürfte dafür bestimmend sein, ob sich das Virus in der Wirtszelle vermehren kann oder nicht. Nach Untersuchungen von SHU (26) kann es als sicher gelten, daß in Kaninchengranulozyten keine Vermehrung von Newcastle disease Virus stattfindet. Es wird vielmehr durch die lysosomalen Enzyme abgebaut. Daraus könnte geschlossen werden, daß das Newcastle disease Virus nicht aktiv in den Stoffwechsel der Wirtszelle eingreift, sondern vielmehr katalysatorisch Enzymausschüttungen hervorruft. Diese Annahme bildete die Grundlage für den Versuchsplan und das Verständnis der Ergebnisse der in - vitro - Experimente.

Da die Granula besonders enzymaktiv sind, wurden Kaninchen - Exsudat - Granulozyten zerstört und

daraus, nach dem Verfahren von HIRSCH und COHN (5), eine Fraktion mit Granula und eine Fraktion mit Granulozytenzellwänden hergestellt. Mit beiden Fraktionen ist geprüft worden, inwieweit eine virusinduzierte Ausschüttung von verschiedenen Enzymen erfolgt. Enzymaktivitäten von Lactatdehydrogenase (9), Lysozym (11), Trypsin (7, 12, 16), Lipase (14, 19, 22, 23) und alkalischer Phosphatase (8, 13, 17, 33) sind bereits unter anderem in menschlichen Leukozyten nachgewiesen worden. Es war allerdings den Angaben nicht immer zu entnehmen, ob es sich um Granulozyten handelte oder um ein Gemisch verschiedener Leukozytenarten. Die Granula als Hauptenzymträger erwiesen sich als besonders geeignet, um Schwankungen der Enzymausschüttungen unter dem Einfluß des Newcastle disease Virus zu erfassen.

Es ist anzunehmen, daß unter dem Einfluß von Newcastle disease Virus eine Schädigung oder Zerstörung der Phospholipidhülle der Lysosomen eintritt. Hierdurch erfolgt bei intakten Granulozyten eine vermehrte Abgabe der Enzyme in das Zytoplasma, während bei den isolierten Granula die Enzyme frei in die Suspensionslösung gelangen.

Alle Versuche wurden grundsätzlich mit zwei Ansätzen durchgeführt. Der eine bestand aus einer Granulasuspension mit Newcastle disease Virus, der andere enthielt eine Granulasuspension , dem zum Volumenausgleich nur physiologische Kochsalzlösung zugegeben wurde.

Die Lactatdehydrogenase, ein basisches Protein, zeigt unter Viruseinwirkung einen steilen Aktivitätsanstieg (Abb. 2), während im Kontrollansatz zunächst keine, gegen Ende der Inkubationszeit aber eine gesteigerte Zunahme der Aktivität beobachtet wurde. Auffallend ist, daß bereits 30 Minuten nach Viruszugabe das Maximum der Enzymaktivität erreicht wurde. Die Granulamembran scheint demnach schon kurz nach der Viruszugabe ihr Durchlässigkeitsmaximum für die Lactatdehydrogenase erreicht zu haben. Im Kontrollansatz war zu diesem Zeitpunkt noch keine Schädigung der Phospholipidhülle zu erkennen. Der Aktivitätsabfall unter Viruseinfluß dürfte auf der erhöhten Wirkung proteolytischer Enzyme beruhen.

Beim Lysozym dagegen kommt es nicht unmittelbar nach Viruszugabe zu einer maximalen Aktivitätssteigerung. Auch der Abfall der Enzymwirkung tritt langsamer ein

als bei Lactatdehydrogenase, die bereits 60 Minuten nach Viruszugabe deutlich vermindert ist. Eine vergleichbare Reduktion des Lysozyms konnte erst nach 90 Minuten beobachtet werden. Möglicherweise ist die Verminderung der Enzymaktivität ebenfalls auf eine vermehrte Freisetzung proteolytischer Enzyme zurückzuführen.

Bei Trypsin war das Aktivitätsmaximum 30 Minuten vor Versuchsende im virusfreien Ansatz erreicht. Im Virusansatz dagegen stieg die Enzymausschüttung bis zum Ende des Versuches stetig an. Demnach verhielt sich die Trypsin - Aktivität umgekehrt wie Lactatdehydrogenase und Lysozym. Diese Feststellung stützt die Vorstellung, daß die rasche Verminderung der letztgenannten Enzyme die Folge einer proteolytischen Spaltung ist.

Von anderen Autoren wurde berichtet (15), daß eine Injektion von Granulozytengranula ohne vorherige Induktion in Kaninchen eine Fieberreaktion hervorruft. Diese Beobachtung konnte nicht bestätigt werden. Wurden dagegen die Zellgranula mit Newcastle disease Virus inkubiert, so konnte nach Ultrazentrifugation im Überstand ein endogenes Pyrogen nachgewiesen werden.

Die Frage kann jedoch noch nicht beantwortet werden, ob es mit dem endogenen Fieberstoff identisch ist, der von der intakten Zelle unter Viruseinwirkung gebildet und freigesetzt wird. Kürzlich haben KOSEL und KOHLHAGE (1968) gezeigt, daß die Bildung des virusinduzierten endogenen Pyrogens durch Actinomycin blockiert werden kann. Der Fieberstoff scheint demnach de novo synthetisiert zu werden.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Injiziertes Newcastle disease Virus bewirkt beim Kaninchen selbst in höchsten Dosen keine signifikante Änderung der Enzymwerte (Lactatdehydrogenase, Prypsin, Lysozym, Lipase, alkalische Phosphatase) im Serum. Bei in - vitro - Versuchen mit von Kaninchen isolierten Granulozytengranula konnten jedoch qualitative und quantitative Hinweise über virusinduzierte Veränderungen der Enzymaktivität gewonnen werden. Lysozym, Lactatdehydrogenase und Trypsin zeigten unter Viruseinfluß eine deutlich gesteigerte Aktivität, während sich die Werte für Lipase und alkalische Phosphatase nicht veränderten. Dem Enzymanstieg folgte ein rascher Abfall, der auf die Wirkung proteolytischer Fermente zurückgeführt wird.

Schließlich wurde festgestellt, daß aus isolierten Leukozytengranula des Kaninchens nacn Inkubation mit Newcastle disease Virus ein endogenes Pyrogen freigesetzt wird.

F. LITERATUR

1) ALLISON, A. C., MALLUCCI, L.: Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virusinfected cell cultures.
J. Exper. Med.: 121: 463 - 476 (1965)

2) ATKINS, E., HUANG, W. Ch.: The appeareance of an endogenous pyrogen in the blood following intravenous injection of virus.
J. Exper. Med.: 107: 383 - 401 (1958)

3) ATKINS, E., HUANG, W. Ch.: The relation of tolerance to the production of endogenous pyrogen.
J. Exper. Med.: 107: 415 - 435 (1958)

4) BERTHRONG, M., CLUFF, L. E.: Studies of the bacterial endotoxins on rabbit leukocytes.
J. Exper. Med.: 98: 331 - 348 / 349 - 364 (1953)

5) COHN, Z. A., HIRSCH, J. G.: The isolation and properties of the specific cytoplasmic granulas of rabbit polymorphonuclear leukocytes.
J. Exper. Med.: 112: S. 983 (1960)

6) COLLINS, R. D., WOOD, W. B.: The interaction of leukocytes and endotoxins in vitro.
J. Exper. Med.: 110: 1005 - 1016 (1959)

7) COOKE, J. V.: Proteolytic leucocytic enzyme in leukemia.
Arch. Internal Med.: 49: 836 - 845 (1932)

8) CRAM, D. M., ROSSITER, R. J.: Phosphatase of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
Can. J. Res. Sect. E.: 27: 290 - 298 (1949)

9) DIOGUARDI, N., AGOSTONI, A., FIORELLI, G., LOMONT, B.: Characterisation of lactic dehydrogenase of normal human granulocytes.
J. Lab. Clin. Med.: 61: 713 - 716 (1963)

10) EHRLICH, P.: Über die spezifischen Granulationen des Blutes.
Arch. Anat. und Physiol., physiol. Abt. (1879)

11) FALANGAN, P., LIONETTI, F.: Lysozyme distributation in blood.
Blood 10: 497 - 501 (1955)

12) FLEISCHER, G. A.: Peptidases in human leucocytes.
Ann. N. Y. Sci. 59: 1012 - 1018 (1955)

13) FOLLETTE, J. H., VALENTINE, W. N. and REGNOLDS, J.: A comparison of human leucocyte phosphatase activity toward sodium - ß - glycerophosphate, adenosine - 5 - phosphate and glucose - 1 - phosphate. Blood 14: 415 - 422 (1959)

14) HARDIN, E. B., VALENTIN, J. H., FOLLETTE and LAWRENCE, J. S.: Esterase and lipase activity of leucocytes and erytrocytes in health and disease. Amer. J. Med. Sc. 229: 397 - 402 (1955)

15) HERION, J. C., SPITZNAGEL, J. K., WALKER, R. I., and ZEYA, H. I.: Pyrogenicity of granulocyte lysosomes. Amer. J. Physiol. 211: 693 - 698 (1966)

16) HUSFELDT, E.: Proteolytische Enzyme in den Leukozyten des Menschen. Zschr. physiol. Chem. 194: 137 - 165 (1931)

17) KENNY, J. J., and MOLONRY, W. C.: Leucocyte alkaline phosphatase. Behavior duting prolonged incubation and infected in normal and leucemic leucocytes. Blood 12: 295 - 302 (1957)

18) KOSEL, und KORLHAGE, H. (1968) : noch nicht veröffentlicht.

19) NEES, F.: Über die lipolytische Fähigkeit der weißen Blutkörperchen.
Biochem. Zschr. 124: 156 - 164 (1921)

20) POLLMANN, W.: Habilitationsarbeit Marburg / Lahn (1968)

21) RAFTER, G. W., CHEUK, S., KAISER, D., WOOD, W. B.: Studies on the pathogenesis of fever. XIV. Further observations on the chemistry of leucocytic pyrogen.
J. Exper. Med. 123: 433 - 444 (1966)

22) ROSSITER, R. J., WONG, E.: Esterase of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
J. Biol. Chem. 180: 933 - 946 (1949)

23) SEABRA, P.: Oxidase and lipase of the leucocytes.
Am. N. Y. Sci. 59: 1022 - 1025 (1955)

24) SEELIGMAN, A. M., NACHLAS, M. M.: Lipase. Methode der enzymatischen Analyse.
H. K. BERGMEYER, Verlag Chemie 1962: S. 776

25) SEVER, J. L.: Application of a microtechnique to viral serological investigation.
J. Emmunol. 88: 320 - 329 (1962)

26) SHU, H. L.: 1967 unveröffentlicht

27) SHU, H. L., KOHLHAGE, H., POLLMANN, W.: Gleichzeitige Induktion von endogenem Pyrogen und Interferon durch Myxoviren.
Zbl. Bakt. Abt. I. Ref. 206: 113 (1967)

28) SIEGERT, R., POLLMANN, W., SHU, H. L.: Zur chemischen Natur des endogenen, durch Myxoviren induzierten Pyrogens.
Zschr. Naturforsch. 22 b: 320 - 323 (1967)

29) SIEGERT, R.: Natur und Wirkungsmechanismus der Viruspyrogene.
Dtsch. med. Wschr.: 817 - 818 (1967)

30) SIEGERT, R.: Toxizität und Pyrogenität animaler Viren.
Zbl. Bakt. I. Org. 205: 110 - 121 (1967)

31) SIEGERT, R., BRAUNE, P.: The Pyrogen of Myxoviruses. I. Induction of hyperthermia and its tolerance.
Virology 24: 209 - 217 (1964)

32) SMOLELIS, A. N., HARTSELL, S. E.: The determination of lysozym.
J. Bact. 58: 731 - 736 (1949)

33) TRUBOWITZ, S., FELDMANN, D., MORGENSTERN, S. W., HUNT, V. M.: The isolation, purification and properties of the alkaline phosphatase of human leucocytes.

Biochem. J. 80: 369 - 374 (1961)

34) WROBLEWSKI, F., J. S. La. DUE:

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90: S. 210 (1955)

LEBENSLAUF

Am 26. 1. 1940 wurde ich als zweiter Sohn des Bezirkszollkommissars Konrad Evers und seiner Frau Erika, geb. Faust, in Waidhofen / Ybbs in Niederösterreich geboren. Im Oktober 1945 mußten wir Österreich verlassen und lebten danach bis 1948 in Groß Rhüden bei Seesen am Harz. Dort wurde ich zu Ostern 1946 eingeschult. Vom Herbst 1948 an, bis zum Januar 1951 wohnten wir in Wolfenbüttel. Seit Februar 1951 leben wir in Braunschweig. Dort legte ich im Februar 1961 an der Hoffmann - von - Fallersleben - Schule das Abitur ab. Seit dem Sommersemester 1961 studierte ich in Würzburg Zahnheilkunde. Im Februar 1965 bestand ich dort die zahnärztliche Vorprüfung. Im Sommersemester 1965 studierte ich in Kiel. Seit dem Wintersemester 1965 / 66 bin ich an der Universität in Marburg an der Lahn eingeschrieben gewesen, wo ich am 19. 1. 1968 die zahnärztliche Prüfung bestand. Seit dem 1. März 1968 bin ich in Braunschweig als Assistent in einer zahnärztlichen Praxis tätig. Diese Assistententätigkeit wurde im Juli, August und September 1968 unterbrochen durch meine Einberufung zu einer dreimonatigen Wehrübung zur Bundeswehr als Stabsarzt.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten

in Würzburg:	in Kiel:	in Marburg an der Lahn:
Bauereisen	Arndt	Bommer
Briegleb	Drube	Gedigk
Hahn	Hahn	Hennis
Hartmann	Kricke	Hering
Hünig	Löhr	Heuser
Krause	Portwich	Janke
Kulenkampf	Rethmann	Korb
Müller	Spreter von Kreudenstein	Lehmann - Grube
Neubert		Mann
Peiper	Stüben	Niemeyer
Roedig	Uhlig	Pfütz
Turba		Pantke
Scheer		Rodeck
Schiebler		Salfeld
Schlampp		Schiff
Wüstenfeld		Schmid
		Siegert
		Siess
		Staib
		Streicher
		Stohmeyer